

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2001-501173

(P2001-501173A)

(43)公表日 平成13年1月30日(2001.1.30)

(51)Int.Cl.⁷A 6 1 K 33/24
9/127
47/30
A 6 1 P 35/00

識別記号

F I

A 6 1 K 33/24
9/127
47/30
A 6 1 P 35/00

テマコード*(参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁)

(21)出願番号 特願平10-510888
 (86) (22)出願日 平成9年8月19日(1997.8.19)
 (85)翻訳文提出日 平成11年2月22日(1999.2.22)
 (86)国際出願番号 PCT/US97/14541
 (87)国際公開番号 WO98/07409
 (87)国際公開日 平成10年2月26日(1998.2.26)
 (31)優先権主張番号 60/024,350
 (32)優先日 平成8年8月23日(1996.8.23)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アルザ コーポレイション
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025,
 メンロ パーク, ハミルトン コート
 960
 (72)発明者 アブラ, ロバート エム.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94112,
 サン フランシスコ, ジャドソン アベニ
 ュー 143
 (72)発明者 レイズ, カレン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 95124,
 サン ホセ, ラフトン ドライブ 5095
 (74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シスプラチナ化合物を含有するリポソーム

(57)【要約】

捕獲されたシスプラチナ化合物を含有するリポソーム組成物が記載される。リポソームは、内部表面および外部表面における親水性ポリマー鎖の表面被膜、および捕獲されたシスプラチナ化合物を有する。化合物は、ポリマー被膜を欠損するリポソームと比較する場合、実質的により大きな保持力でリポソーム中に捕獲される。上記組成物を調製する方法もまた、記載される。

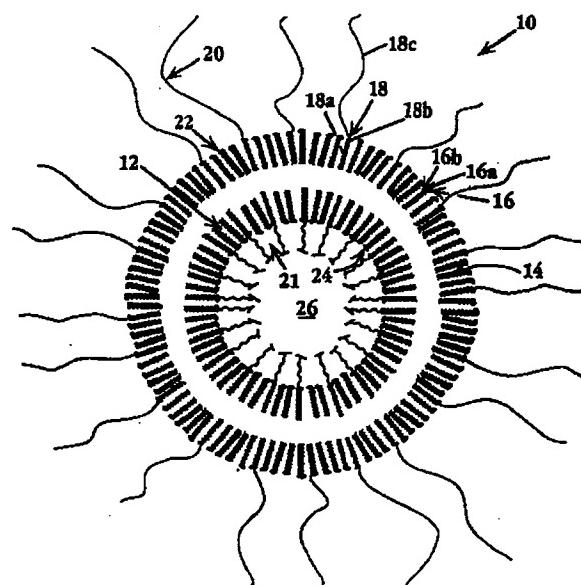


Fig. 1

【特許請求の範囲】

1. 捕獲されたシスプラチン化合物を含有するリポソーム組成物であって、水性リポソーム区画を規定する外部表面および内部表面を有し、そして小胞形成脂質から構成され、そして約1～20モルパーセントの間の小胞形成脂質が親水性ポリマーで誘導体化されている、リポソームであって、該リポソームは、該親水性ポリマーが該内部表面および該外部表面の両方において親水性ポリマー鎖の被膜を形成するように形成されている、リポソーム、および
該リポソーム中に捕獲されたシスプラチン化合物であって、該化合物は該ポリマー被膜を欠損するリポソームと比較する場合、リポソーム中に実質的により大きな保持力で捕獲されている、シスプラチン化合物、
を含む、リポソーム組成物。
2. 請求項1に記載の組成物であって、前記親水性ポリマー鎖が、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリエチレングリコール、およびポリアスパルタミドからなる群より選択される親水性ポリマーからなる、組成物。
3. 請求項2に記載の組成物であって、前記親水性ポリマー鎖が、ポリエチレングリコールからなる、組成物。
4. 請求項1に記載の組成物であって、前記リポソームが約80～160nmの間のサイズを有する、組成物。
5. 請求項1に記載の組成物であって、前記小胞形成脂質が水素化されたダイズホスファチジルコリンであり、および前記誘導体化された小胞形成脂質がポリエチレングリコールと誘導体化されたジステアリルホスファチジルエタノールアミンである、組成物。

6. 請求項1に記載の組成物であって、前記シスプラチン化合物がシスプラチン

、またはカルボプラチン、オルマプラチン、オキサリプラチン、DWA2114R、ゼニ
プラチン、エンロプラチン、ロバプラチン、CI-973、254-S、およびJM-216から
なる群より選択されるシスプラチナナログである、組成物。

7. 請求項6に記載の組成物であって、前記シスプラチナ化合物が、シスプラチ
ンである、組成物。

8. 請求項7に記載の組成物であって、前記シスプラチナ化合物が、約10～20 μ
g/mg総脂質の間の薬物対脂質比で捕獲される、組成物。

9. 請求項1に記載の組成物であって、前記リポソームが、50～200mg/mlの間の
リポソーム脂質濃度で、水性培地中に懸濁され、そして該組成物が60°Cで6時間
保存される場合、約90%を越える捕獲された白金のパーセントによって特徴づけ
られる、組成物。

10. リポソーム中にシスプラチナ化合物を捕獲する方法であって、以下の工程

、
シスプラチナ化合物の水溶液を、室温における該化合物の溶解性よりもその溶
解性を増加するのに十分な温度に加熱する工程；

該加熱した溶液に、小胞形成脂質、および親水性ポリマーと誘導体化された約
1～20モルパーセントの間の小胞形成脂質を添加する工程；および

該添加により、該親水性ポリマーの内部表面被膜および外部表面被膜を有する
リポソームを形成する工程であって、該シスプラチナ化合物は、該リポソーム中
に、該内部表面被膜および該外部表面被膜を欠損するリポソームにおけるよりも
実質的により大きな保持力で、捕獲される、工程、

を包含する、方法。

11. 請求項10に記載の方法であって、前記加熱する工程が、ネイティブなシ
スプラチナを、シスプラチナ溶解性において、その室温溶解性をこえて2倍の増
加を達成するのに十分な温度まで加熱する工程を包含する、方法。

12. 請求項11に記載の方法であって、前記添加する工程が、シスプラチナ溶
液の温度の約10°C以内まで加熱された小胞形成脂質の溶液を添加する工程を包含
する、方法。

13. 請求項11に記載の方法であって、前記添加する工程が、シスプラチン化合物を含有する溶液が加熱される温度の約10°C以内の相転移温度を有する、小胞形成脂質を含有する溶液を添加する工程を包含する、方法。
14. 請求項10に記載の方法であって、前記添加する工程が、40~70°Cの間の相転移温度を有する小胞形成脂質を含有する溶液を添加する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

シスプラチン化合物を含有するリポソーム

発明の分野

本発明は、捕獲されたシスプラチン化合物を含有するリポソーム組成物に関する。

参考文献

Freise, J. ら、Arch. Int. Pharmacodyn. 258:180-192(1982)。

Gondal, J.A. ら、Eur. J. Cancer 29A(11):1536-1542(1993)。

Mabrey, S. ら、Biochem. 17:2464-2468(1978)。

Martin, F. J., Specialized Drug Delivery Systems-Manufacturing and Production Technology, (P. Tyle編) Marcel Dekker, New York, 267-316頁 (1990)

。

Physician's Desk Reference第48版、Medical Economics Data Production Co., Montvale, NJ(1994)。

Potkul, R.K. ら、Am. J. Obstet Gynecol. 164(2):652-658(1991)。

Prestayko, A.W. ら、Cancer and Chemo. 第3巻(Crookeら編) Academic Press, NY, 133-154(1981)。

Steerenberg, P.A. ら、International Journal of Pharmaceutics 40:51-62(1987)。

Sur, B. ら、Oncology 40:372-376(1983)。

Szoka, F., Jr. ら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467(1980)。

Tsong, T.Y., Biochem. 14:5409-5414, 5415-5417(1975)。

Weiss, R.B. ら、Drugs 46(3):360-377(1993)。

発明の背景

シスプラチニ-シス-ジアミン-ジクロロプラチナ(II) --は、生殖細胞ガンの全身性処置において使用されるより有効な抗腫瘍剤の一つである。この化学療法

薬物は、実験動物およびヒト腫瘍における腫瘍モデル（例えば、子宮内膜新生物、膀胱新生物、卵巣新生物、および精巣新生物、ならびに頭部および頸部の偏平

上皮細胞ガン腫) の処置において非常に有効である (Surら、1983 ; Steerenbergら、1987)。

他のガン化学療法剤のように、シスプラチンは非常に毒性の薬物である。シスプラチンの主要な不利益は、シスプラチンの極度の腎毒性（これは主要な用量制限因子である）、わずか数分の循環半減期での、腎臓を介するシスプラチンの迅速な排出、および血漿タンパク質に対するシスプラチンの強力な親和性である (Freiseら、1982)。

薬物の毒性を最小化する試みとしては、組合せ化学療法、シスプラチニアナログの合成 (Prestayko, 1991 ; Weissら、1993)、免疫療法、およびリポソーム中の捕獲 (Surら、1983 ; Weissら、1993) が挙げられる。リポソーム中に捕獲される抗新生物剤（シスプラチンを含む）は、抗腫瘍活性を保持しながら、遊離の形態の因子に比べて、減少された毒性を有する (Steenenbergら、1987 ; Weissら、1993)。

しかし、シスプラチンは、薬物が低水溶性（室温で約1.0mg/ml）および低脂肪親和性であるので（これらの両方は、低い薬物／脂質比の一因である）、リポソーム中に効率よく捕獲することが困難である。

シスプラチンを含有するリポソームは、別の問題（組成物の安定性）を被る。特に、保存中のリポソームにおける薬物の保持は、認識される問題であり (Freiseら、1982 ; Gondalら、1993 ; Potkulら、1991 ; Steerenbergら、1987 ; Weissら、1993)、ならびに4°Cにて数週間といった、シスプラチンを含有するリポソームの制限された貯蔵寿命が報告されている (Gondalら、1993 ; Potkulら、1991)。

発明の要旨

1つの局面において、本発明は、捕獲されたシスプラチン化合物を含有するリポソーム組成物を包含する。組成物は、水性リポソーム画分を規定する外部表面および内部表面を有するリポソームを含む。リポソームは、小胞形成脂質、および親水性ポリマーと誘導体化された約1～20モルパーセントの間の小胞形成脂質

からなる。リポソームは、親水性ポリマーが内部表面および外部表面の両方にお

いて親水性ポリマー鎖の被膜を形成するように、形成される。シスプラチン化合物は、内部および外部ポリマー表面被膜を欠損するリポソームにおけるよりも実質的により大きな保持力でリポソーム中に捕獲される。

1つの実施態様において、シスプラチン化合物はネイティブなシスプラチンであり、そして約10~20 μg/ml総脂質の間の薬物対脂質比にて、リポソーム中に捕獲される。別の実施態様において、シスプラチン化合物はシスプラチニアナログである。

別の実施態様において、親水性ポリマー鎖は、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリエチレングリコール、およびポリアスパルタミドからなる群より選択される親水性ポリマーからなる。好ましい実施態様において、親水性ポリマーはポリエチレングリコールである。

1つの実施態様において、リポソームは約80~160nmの間の、好ましくは100~140nm、最も好ましくは約100~120nmの間のサイズを有する。

好ましい実施態様において、小胞形成脂質は、水素化されたダイズホスファチジルコリンであり、そして誘導体化された小胞形成脂質は、ポリエチレングリコールと誘導体化されたジステアリルホスファチジルエタノールアミンである。

別の局面において、本発明は、室温での化合物の溶解性をこえてその溶解性を増加するのに十分な温度まで、シスプラチン化合物の水溶液を加熱することにより、リポソーム中にシスプラチン化合物を捕獲する方法を包含する。加熱されたシスプラチン化合物溶液に、小胞形成脂質、および親水性ポリマーと誘導体化された約1~20モルパーセントの小胞形成脂質が添加される。この添加により、親水性ポリマー鎖の内部表面被膜および外部表面被膜を有するリポソームが形成され、そしてシスプラチン化合物は、このリポソーム中に、ポリマー被膜を欠損するリポソームにおけるよりも実質的により大きな保持力で、捕獲される。

方法の1つの実施態様において、シスプラチニ化合物は、ネイティブなシスプラチニであり、そしてシスプラチニ水溶液は、シスプラチニ溶解性において、その室温における溶解性をこえて2倍の増加を達成するのに十分な温度に加熱される。

別の実施態様において、シスプラチニ溶液の温度の約10°C以内に加熱された小胞形成脂質の溶液が、シスプラチニ化合物溶液に添加される。

別の実施態様において、シスプラチニ溶液に添加されるのは、シスプラチニ溶液が加熱される温度の約10°C以内の相転移温度を有する、小胞形成脂質を含有する溶液である。

別の実施態様において、シスプラチニ溶液に添加される小胞形成脂質溶液は、40~70°Cの間の相転移温度を有する小胞形成脂質を含有する。

本発明のこれらおよび他の目的ならびに特徴は、本発明の以下の詳細な記載が、添付の図面と合わせて読まれる場合、より十分に理解される。

図面の簡単な説明

図1は、本発明に従って形成されるリポソームの模式図である；

図2は、小胞形成脂質をポリアルキルエーテルと誘導体化するための、一般的な反応スキームを示す；

図3は、塩化シアヌル酸結合剤を介して、ポリエチレングリコールと誘導体化されたホスファチジルエタノールアミンを調製するための反応スキームである；

図4は、ジイミダゾール活性化試薬の手段により、ポリエチレングリコールと誘導体化されたホスファチジルエタノールアミンを調製するための反応スキームを示す；

図5は、C26結腸腫瘍モデルで接種し、そして12、19、および26日目に、生理食塩水（■）、遊離のシスプラチニ（▲）、遊離のカルボプラチニ（●）を用いて、またはリポソーム捕獲化シスプラチニ（▼）を用いて処置したマウスについての接種後の日数の関数としての、1mm³中の腫瘍容量のプロットである；

図6は、C26結腸腫瘍モデルで接種し、そして12、19、および26日目に、生理食塩水（■）、遊離のシスプラチニ（▲）を用いて、または3つの処方レジメ

(▼、◆、●)に従うリポソーム捕獲化シスプラチンを用いて処置したマウスについての接種後の日数の関数としての、 1 mm^3 中の腫瘍容量のプロットである；そして

図7は、Lewis肺ガン腫で接種し、そして7、14、および21日目に、生理食塩水 (■)、遊離のシスプラチンIV (◆)、遊離のシスプラチンIP (●) を用いて、またはリポソーム捕獲化シスプラチンIV (▲) あるいはIP (▼) を用いて処置したマウスについての接種後の日数の関数としての、 1 mm^3 中の腫瘍容量のプロットである。

発明の詳細な説明

I. リポソーム組成物

本発明のリポソーム組成物は、安定に捕獲されたシスプラチン化合物を有するリポソームを含む。本明細書中で使用されるように、「安定に捕獲されたシスプラチン化合物」は、シスプラチン化合物が投与の前にリポソーム内に実質的に保持されるように、リポソーム内に、主としてリポソームの水性空間内に捕獲されたネイティブなシスプラチンまたはシスプラチニアナログをいう。

図1は、本発明に従って調製されたリポソーム10を示す。これは、内部脂質二重層12および外部脂質二重層14を含む。内部脂質二重層および外部脂質二重層は、小胞形成脂質（例えば、脂質16、これは極性頭部基16aおよび疎水性尾部16bを含む）で優勢に形成される。例示的な小胞形成脂質を以下に列挙する。

リポソーム10はまた、親水性ポリマーと誘導体化された小胞形成脂質（例えば、図1における誘導体化された脂質18）を含む。誘導体化された脂質18は、疎水性尾部18a、極性頭部基18b、および以下に記載の手段で極性頭部基に付着された親水性ポリマー18cを含む。親水性ポリマーは、外部脂質二重層14の外部表面22および内部脂質二重層12の内部表面24の両方において、親水性ポリマー鎖の表面被膜20、21を提供する。親水性ポリマー鎖の外部表面被膜は、インビボでの長い血液循環寿命を有するリポソームを提供するのに効果的である。以下に説明するように、内部表面および外部表面被膜は、長い貯蔵寿命を有するシスプラチニリポソーム組成物（例えば、シスプラチン化合物がリポソーム中に保持される安定な

リポソーム組成物)を提供するにおいて、さらに効果的である。

リポソーム10はまた、シスプラチン化合物(例えば、ネイティブなシスプラチニン、またはシスプラチニアナログ)を、捕獲された形態で含む。薬物は、溶解された形態または沈殿された形態で、内部水性画分26中に捕獲される。本発明を支持して行われる研究において、ネイティブなシスプラチニンは、リポソームの内部表面および外部表面における親水性ポリマー鎖の表面被膜を伴って調製されたリポソーム中に捕獲された。これらのリポソームは、親水性ポリマー被膜を欠損するリポソームと比較すると、より長い期間にわたってリポソーム内に薬物を保持する能力により明らかであるように、改善された安定性を有した。

A. 小胞形成脂質成分

本発明のリポソーム組成物は、主に小胞形成脂質から成る。このような小胞形成脂質は、(a) リン脂質により例示されるように、水中で自発的に二重層小胞を形成し得るか、または(b) 二重層膜の内部の疎水性領域と接触した疎水性部分を有して、そしてその極性頭部基部分は膜の外部の極性表面に配向されて、脂質二重層中に安定に組み込まれる。

このタイプの小胞形成脂質は、好ましくは2つの炭化水素鎖(代表的には、アシル鎖)および極性頭部基を有するものである。種々の合成小胞形成脂質および天然に存在する小胞形成脂質があり、リン脂質(例えば、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルイノシトール(PI)、およびスフィンゴミエリン(SM))を包含し、ここで、2つの炭化水素鎖は、代表的には、約14~22炭素原子の長さであり、そして様々な不飽和度を有する。本発明における使用のために好ましい脂質は、水素化されたダイズホスファチジルコリン(HSPC)である。

アシル鎖が様々な飽和度を有する、上記の脂質およびリン脂質は、市販されているか、または公開された方法に従って調製され得る。

小胞形成脂質は、特定の流動性度または剛性度を達成するために、血清中のリポソームの安定性を制御するために、およびリポソーム中に捕獲された薬剤の放出の速度を制御するために、選択され得る。より剛性な脂質二重層、または液体結晶二重層を有するリポソームは、比較的固い脂質(例えば、比較的高い相転移

温度（例えば、80°Cまで）を有する脂質）の組込みにより達成される。固い、すなわち、飽和された脂質は、脂質二重層におけるよりも大きな膜剛性に寄与する。コレステロールのような他の脂質成分もまた、脂質二重層構造における膜剛性に寄与することが知られている。

脂質流動性は、比較的流動性の脂質（代表的には、比較的低い、液体から液体-結晶への相転移温度（例えば、室温でまたは室温よりも低い（20～25°C））を有する脂質層を有する脂質）の組込みにより達成される。

本発明のシスプラチナリポソーム組成物において使用するために適切な脂質は、室温または室温よりも低い相転移温度を有する小胞形成脂質、および高い相転移温度を有する小胞形成脂質を含む。好ましい実施態様において、約40～70°Cの間の相転移温度を有する小胞形成脂質が用いられる。別の実施態様において、リポソームの形成において使用される脂質は、記載されるように、リポソーム調製の間、シスプラチナ化合物を含む溶液が加熱される温度まで約20°C、より好ましくは10°C、最も好ましくは5°Cの相転移温度を有する脂質である。脂質の相転移温度は、種々の供給源（例えば、Avanti Polar LipidsカタログおよびLipid Thermotropic Phase Transition Database (LIPIDAT, NIST Standard Reference Database 34)において、作表されている。

リポソームは、小胞またはリン脂質から優勢に構成されるリポソームを安定化し得る他の脂質を含み得る。この目的のために頻繁に用いられる脂質は、25～40モルパーセントの間のコレステロールである。二重層中の0～20モルパーセントの間のコレステロールでは、コレステロールおよびリン脂質類および純粋なリン脂質を含有する、別々のドメインが存在する (Mabreyら、1978)。これらの二重層は、水に対して増加した透過性を示す (Tsong、1975)。本発明の1つの実施態様において、以下に記載するように、コレステロールはリポソーム組成物に含まれる。

本発明の方法において、シスプラチナ化合物を含有するリポソームは、シスプラチナ化合物の加熱された水性溶液に、親水性ポリマーと誘導体化された1～20モルパーセントの小胞形成脂質を含有する、小胞形成脂質の混合物を添加することにより調製される。脂質は、適切な脂質溶媒（例えば、エタノール、メタノー

ル、クロロホルム、またはそれらの混合物) 中に溶解される。

脂質を添加する前に、シスプラチン化合物の水溶液は、シスプラチン化合物の室温での溶解性をこえてその溶解性を増加するのに十分な温度に加熱される。すなわち、溶液は、シスプラチン化合物の室温での水溶性をこえて、少なくとも約2倍、好ましくは3倍、最も好ましくは4倍の溶解性の増加を達成する温度に加熱される。例えば、20~25°Cにて1mg/mlの水溶性を有するシスプラチンは、約63°Cに加熱されて、約8.5mg/mlまで水溶性が増加され得る。シスプラチンおよびシスプラチニアナログの溶解性は、標準的な手順に従って、当業者により容易に決定され得る。

本発明の1つの実施態様において、小胞形成脂質を含有する溶液は、シスプラチン溶液の温度の約20°C、より好ましくは10°C、最も好ましくは5°C以内まで加熱される。

以下に詳述する実施例において、小胞形成脂質HSPC、誘導体化された小胞形成脂質PEG-DSPE、およびコレステロールは、HSPC相転移温度の約52~60°Cの間のすぐ上の約65°Cに加熱されたエタノール中に溶解される。ネイティブなシスプラチニの水溶液は、63~67°Cの間に加熱される。溶液は共に混合されて、捕獲された形態でシスプラチニ化合物を含有するリポソームが形成される。

本発明の方法は、シスプラチニの高度な被包を達成し、代表的には10~20μg薬物/mg脂質の間で被包し、そして外部表面被膜に加えて、リポソーム内に安定に捕獲されたシスプラチニ化合物とともに、親水性ポリマー鎖の内部表面被膜を有するリポソームを提供する。

B. 誘導体化された小胞形成脂質成分

上記のように、本発明のリポソームは、内部脂質二重層表面および外部脂質二重層表面の両方において、親水性ポリマー鎖の表面被膜を有する。表面被膜は、リポソーム組成物中に、親水性ポリマーと誘導体化された約1~20の間のモルパーセントの脂質を含むことにより提供される。

小胞形成脂質との誘導体化に適切な親水性ポリマーとしては、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリメチルオキサゾリン、ポリエチルオキ

サゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリエチレングリコール、およびポリアスパルタミドが挙げられる。ポリマーは、ホモポリマーとして、またはブロックもしくはランダムコポリマーとして使用され得る。

好ましい親水性ポリマー鎖は、ポリエチレングリコール(PEG)であり、好ましくは500～10,000ダルトンの間の、より好ましくは1,000～5,000ダルトンの間の、分子量を有するPEG鎖としてである。メトキシ-またはエトキシ-結合されたPEGのアナログはまた、好ましい親水性ポリマーであり、種々のポリマーのサイズ(例えば、120～20,000ダルトン)で市販されている。

親水性ポリマーとの誘導体化に適切な小胞形成脂質としては、上で列挙した任意の脂質、および特に、ジステアリルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)のようなリン脂質が挙げられる。PEGと誘導体化されたDSPEの調製は、以下に記載される(実施例1)。

誘導体化された脂質は、脂質小胞の形成の間、小胞形成脂質とともに、親水性ポリマーと誘導体化された両親媒性脂質を含むことにより、リポソーム中に組み込まれる。

一旦リポソームが形成されると、図1に関して論じたように、親水性ポリマー鎖は、脂質二重層の内部表面および外部表面の両方において、鎖の表面被膜を提供する。重要なことに、表面被膜は、以下に記載するように、リポソームの安定性を改善するのに効果的である。表面被膜はまた、このような被膜の不在下でのリポソームの血液循環時間を延長するのに効果的である。血液循環時間の増強の程度は、共有に係る米国特許第5,013,556号において記載されるように、好ましくは、ポリマー被膜の不在下で達成されるよりも数倍である。

C.他のリポソーム成分

本発明の組成物におけるリポソームは、標的化分子(抗体、抗体フラグメント、または細胞表面認識分子を含む)のような他の成分を含み得、これらは、親水性ポリマー鎖によりリポソームに付着される。例えば、上述のように、小胞形成

脂

質は親水性ポリマー鎖を用いて誘導体化され、そして親水性ポリマーはその官能化された末端に抗体を結合するために、末端官能化される。官能化された末端基は、アルデヒド基に対して反応性であるヒドラジドまたはヒドラジン基であり得るが、抗体への結合のための任意の多くのPEG末端反応基が使用され得る。ヒドラジドはまた、活性エステルまたはカルボジイミド活性化カルボキシル基によりアシル化され得る。アシル化種として反応性のアシルアジド基は、ヒドラジドから容易に得られ得、そしてアミノ含有分子の付着を可能にし得る。官能化された末端基はまた、ジスルフィド結合を介する抗体または他の分子のリポソームへの結合については、2-ピリジルジチオ-プロピオンアミドであり得る。

D. シスプラチン化合物

本発明のリポソーム組成物は、ガン治療における、より好ましくは腫瘍治療における使用のために意図される。シスプラチン化合物はリポソーム内に捕獲され、そしてリポソーム組成物は被験体に投与される。本明細書において言及される場合、シスプラチン化合物はネイティブなシスプラチンおよびそのアナログをいう。好ましい実施態様において、シスプラチン化合物はネイティブなシスプラチニンであり、そして別の実施態様において、シスプラチン化合物はシスプラチニアナログ、好ましくは親水性のシスプラチニアナログである。

本明細書中でシスプラチンともいわれる、ネイティブなシスプラチニンは、シス配置で2つの塩素原子および2つのアンモニア分子により囲まれる白金の中心原子を含有する重金属錯体である。シスプラチニンは、分子式 $\text{PtCl}_2\text{H}_6\text{N}_2$ および分子量300.1を有する黄色粉末である。シスプラチニンは、室温で、水または生理食塩水に1mg/mlで可溶性であり、そして207°Cの融点を有し (Physician's Desk Reference, 1994) そして270°Cで分解する。

シスプラチニン分子における塩素原子は、水またはスルフヒドリル基のような求核剤による化学置換反応に供される。0.1M NaClの存在下の生理学的pHにおいて、主な分子種は、ほぼ等濃度のシスプラチニンおよびモノヒドロキシモノクロロシス-ジアミン白金 (II) である。

薬物は、1mlの水当たり1mgのシスプラチニンおよび9mgのNaClを含有する、滅菌された水溶液として利用可能であり、そしてこの形態で、薬物は、代表的には

約20～120mg/m²の間の用量で、腫瘍治療のために静脈内投与される（Physician's Desk Reference、1994）。薬物は、単独でまたは他の化学療法剤と組み合わせて、ボーラス注射として、または数時間にわたる緩慢な注入として、投与され得る。

単一の薬剤として、シスプラチニンは、例えば、静脈内に4週間毎に1回、100mg/m²の用量で（Physician's Desk Reference、1994）、または5日間毎日および4週間の間隔で反復しての迅速な静脈内注入として与えられる20mg/m²シスプラチニンの用量で（Prestayko、1991）、投与され得る。頭部および頸部の偏平上皮細胞ガンの処置において、80mg/m²の用量で、24時間の注入として静脈内で与えられたシスプラチニンは、好ましい応答を達成した（Prestayko、1991）。

単一の薬剤として活性であるが、シスプラチニンは、しばしば、ビンプラスチン、ブレオマイシン、アクチノマイシン、アドリアマイシン、プレゾニゾン、ビンクリスチンおよびその他を含む他の薬剤と組み合わせて投与される（Prestayko、1991）。例えば、卵巣ガンの治療は、24時間の注入として投与される60mg/m²のシスプラチニンおよび60mg/m²のアドリアマイシンを含み得る。本発明において、組合せ療法は、遊離形態のまたはリポソーム捕獲化形態の、別の化学療法剤（例えば、米国特許第5,527,528号に記載されるリポソーム捕獲化ドキソルビシン）とともに投与されるリポソーム捕獲化シスプラチニンを含み得る。

本発明において、シスプラチニンは、静脈内投与に適切な、約80～160nmの間の、より好ましくは約100～140nmの間の、最も好ましくは約100～120nmの間のサイズのリポソーム中に捕獲される。シスプラチニン含有リポソームは、遊離の薬物について上述で与えた投薬量で投与されるが、しかし、このような投薬量は、リポソーム捕獲により提供される薬物の減少された毒性を考慮して、適宜調節され得る。このような調節された投薬量は、当業者により実験的に容易に決定され得る。

シスプラチニンのリポソーム内濃度は、1～9mgシスプラチニン/mlの間、より好

ましくは4～9mg/mlの間、最も好ましくは6～8.5mg/mlの間である。シスプラチニ含有リポソーム懸濁液は、静脈内投与については、約1～2mgシスプラチニ/ml全懸濁液容量の濃度である。

本発明の別の実施態様において、リポソーム内に捕獲されたシスプラチニ化合物

物は、シスプラチニアナログである。広範囲のシスプラチニアナログが合成されており、ネイティブなシスプラチニによって提供されるものと比較して、異なる抗腫瘍スペクトル、より良好な治療指數、および減少された毒性を提供する。このようなアナログとしては、カルボプラチニ、オルマプラチニ、オキサリプラチニ、DWA2114R、ゼニプラチニ、エンロプラチニ(enloplatin)、ロバプラチニ(lobaplatin)、CI-973、254-S、およびJM-216が挙げられる(Weissら、1993)。スピロプラチニのような、いくつかのシスプラチニアナログは、ネイティブなシスプラチニよりも毒性であることが見出されている。より毒性のアナログは、遊離形態での静脈内投与については所望されないが、このようなアナログは、薬物毒性を減少させるリポソーム捕獲化形態での用途を有し得る。

本発明の目的のために、ある程度の水溶性を有するアナログ(例えば、カルボプラチニ、イプロプラチニ(iproplatin)など)が好ましく、その結果、薬物はリポソームの内側の水性区画に主に捕獲される。

好ましい実施態様において、シスプラチニアナログは、カルボプラチニ(1,1-シクロブタンジカルボキシレートジアミン(diammine)白金)であり、これは白金の4-配位平面錯体における有機配位子を含む。このシスプラチニアナログは、前臨床研究において、シスプラチニに等価なまたはシスプラチニよりも高い抗腫瘍活性、およびより少ない腎毒性を示した(Weissら、1993)。

シスプラチニアナログを含有するリポソームは、ネイティブなシスプラチニに関する上述で論じたように、単独で、または他の化学療法剤と組み合わせて、遊離形態で、またはリポソーム捕獲化形態で、投与され得る。

II. リポソーム組成物の調製

以下のA節は、本発明のリポソームの形成における使用のための、親水性ポリマーを用いて誘導体化された小胞形成脂質の合成を記載する。B節は、誘導体化

された脂質およびシスプラチン化合物を含むリポソームを調製する方法を記載する。

A. 誘導体化小胞形成脂質の調製

図2は、ポリエチレングリコール(PEG)（これは、容易に水に溶解し、小胞

形成脂質に結合され得、そして毒性効果を伴うことなくインビボにおいて許容される）により例示されるような、生体適合性の親水性ポリマーを用いて誘導体化された小胞形成脂質を調製するための一般的な反応スキームを示す。ポリマーは、好ましくは、一方の末端で、メトキシ基、エトキシ基、もしくは他の未反応基によってキャップされるか、または一方の末端が他方の末端よりも反応性であるポリマーである。

以下に記載するように、ポリマーは適切な活性化剤（例えば、シアヌル酸、ジイミダゾール、無水物試薬など）との反応により一方の末端で活性化される。次いで、活性化された化合物は、小胞形成脂質（例えば、ホスファチジルエタノール(PE)）と反応されて、誘導体化された脂質を生成する。

あるいは、小胞形成脂質中の極性基は、ポリマーとの反応のために活性化され得るか、または2つの基は、公知のカップリング方法に従って、協奏カップリング反応において結合され得る。一方の末端においてメトキシ基またはエトキシ基でキャップされたPEGは、種々のポリマーのサイズ（例えば、500～20,000ダルトンの分子量）で商業的に得ることができる。

小胞形成脂質は、好ましくは、上述で列挙したような、2つの炭化水素鎖（代表的にはアシル鎖）および極性頭部基(head group)を有する小胞形成脂質である。

図3は、PE-PEG脂質を生成するための反応スキームを示し、ここではPEGは、塩化シアヌル酸基を介してPEに誘導体化される。反応の詳細は、実施例1において提供される。簡潔には、メトキシ-キャップ化PEGは、図中の、活性化PEG化合物を生成した条件下で、炭酸ナトリウムの存在下で、塩化シアヌル酸で活性化される。この物質は、未反応のシアヌル酸を除去するために精製される。活性化PEG化合物は、これもまた図中に示すように、トリエチルアミンの存在下でPEと反

応されて、所望のPE-PEG化合物を生成する。収率は、PEGの開始量に関して約8～10%である。

ここで記載された方法は、種々の脂質アミン（PE、コレステリルアミン、および糖アミン基を有する糖脂質を含む）に対して適用され得る。

キップ化PEGのようなポリアルキルエーテルを脂質アミンにカップリングす

る第2の方法を、図4に示す。ここで、キップ化PEGはカルボニルジイミダゾールカップリング試薬で活性化されて、図4に示す活性化イミダゾール化合物を形成する。PEのような脂質アミンとの反応は、図に示すPEG-PE化合物において示されるように、アミド結合を介する、脂質へのPEGのカップリングに導く。反応の詳細は、実施例2に与えられる。

B. リポソーム調製物

リポソームは、Szokaら、1980において詳細に記載される技術のような、種々の技術により調製され得る。薬物含有リポソームを調製するための1つの方法は、Szokaにより、および米国特許第4,235,871号において記載される、逆相蒸発法である。逆相蒸発小胞（reverse phase evaporation vesicle）（REV）は、2～4ミクロンの間の代表的な平均サイズを有し、そして主にオリゴラメラである、すなわち、1個または数個の脂質二重層シェルを含む。

別の方法において、マルチラメラ小胞（MLV）が、単純な脂質一フィルム水和技術により形成され得る。この手順において、適切な有機溶媒に溶解された上述において詳述されるタイプのリポソーム形成脂質の混合物は、容器中で蒸発されて、薄膜を形成し、次いで、これは水性の媒質により覆われる。脂質フィルムは水和して、代表的に約0.1～10ミクロンの間のサイズを有するMLVを形成する。

次いで、リポソームは、サイズ分けされ、そしてREVおよびMLVについての1つの有効なサイズ分けの方法は、0.03～0.2ミクロンの範囲の、代表的には0.05、0.08、0.1、または0.2ミクロンの、選択された一様な孔サイズを有する、一連のポリカーボネート膜を通して、リポソームの水溶液を押し出す工程を包含する。膜の孔サイズは、特に、調製物が、同じ膜を通して2回以上押し出される場合、この膜を通しての押し出しにより生成されるリポソームの最大のサイズにほぼ対

応する。ホモジナイゼーション法はまた、100nm以下のサイズにリポソームを小型化するために有用である（Martin、1990）。

本発明において、リポソーム組成物は、代表的には、約25～80モル割合の間の小胞形成脂質、10～40モル割合のコレステロール、および1～20モル割合のポリマーー誘導体化脂質を用いて調製される。1つの例示的なリポソーム処方物は、水素化ダイズホスファチジルコリン（HSPC）およびコレステロール（Chol）を、

約1：1のモル比で、ならびに約1～5モル%の間のDSPE-PEG（PEGの内部および外部脂質二重層表面被膜を有するリポソームを形成するために添加される）を含む。

一般に、以下に記載するように、シスプラチン化合物は、リポソーム形成の間に、薬物を含有する溶液に脂質の溶液を添加することにより、リポソーム中に組み込まれる。

本発明の方法に従って、そして実施例3に記載されるように、mPEG-DSPE、HSPC、およびコレステロール（50.6/44.3/5.1のモル比）からなる、50～200mg/mlの間の全脂質を含有する脂質溶液を、加温（60～65°C）エタノール中にこれらの脂質を溶解することにより調製した。シスプラチンの水溶液（0.9%塩化ナトリウム中の8.5mg/mlシスプラチン）を、室温での化合物の溶解性を上回ってその溶解性を有意に増加するために十分な温度に加温した。具体的には、シスプラチン溶液を、約63°Cに加熱し、これはシスプラチンの溶解性を約8倍に、1mg/mlから8.5mg/mlに増加した。

シスプラチン溶液および脂質溶液と一緒に添加してリポソームを形成し、混合物の温度を60～65°Cの間に維持した。

ダイアフィルトレーションおよび透析に続いて、リポソームを、0.2μmおよび0.1μmのポリカーボネートフィルターを通して押し出して、リポソームのサイズを約100～120nmの間にした。リポソーム懸濁液を室温に冷却し、そして未捕獲の沈殿されたシスプラチンを、濾過およびダイアフィルトレーションにより除去した。

最終のリポソームは、0.9%の塩化ナトリウム中の8.5mg/mlの濃度で被包された

シスプラチニンの内部相、およびスクロース／塩化ナトリウム溶液の外部相を含んだ。以下に記載する、安定性研究のためのパッケージングの前に、および／または投与の前に、リポソーム懸濁液を、スクロース／塩化ナトリウム／ヒスチジン溶液を用いて、1.05mg/mlのシスプラチニン濃度にし、そしてpHを6.5に調整した。

III. リポソーム組成物の安定性

上記（実施例3）のように調製されたリポソームの安定性を、（i）シスプラ

チニンおよび白金の濃度についてリポソーム懸濁液を分析することにより、（ii）被包された白金の割合を測定することにより、（iii）リポソームの大きさを測定することにより、および（iv）リポソーム懸濁液のpHを測定することにより（それぞれ、時間および温度の関数として）評価した。

実施例4に記載のように、シスプラチニン濃度を、高压液体クロマトグラフィー（HPLC）によりシスプラチニン濃度についてリポソーム懸濁液をアッセイすることにより測定した。この方法において、シスプラチニン濃度についてのアッセイの前に、有機溶媒をリポソームサンプルに添加して、脂質二重層を破壊し、捕獲されたシスプラチニンを放出させた。リポソーム懸濁液の白金の濃度を、原子吸収により測定した。被包された白金の割合を、サイズ排除クロマトグラフィーを介して、被包されていない薬物からリポソームを分離し、そして白金含有量についてリポソーム画分および薬物画分の両方を原子吸収によってアッセイすることにより、測定した。リポソームのサイズを、動光散乱（dynamic light scattering）により決定した。

結果を表1にまとめる。

表1
シスプラチニン含有リポソームの安定性

温度	時間 (月)	シスプラチン濃度 (mg/ml)	白金濃度 (mg/ml)	% 被包された白金	リポソームのサイズ (nm)	pH
-40°C	0	0.92	0.71	100	109	6.50
	1	0.86	0.71	99	106	6.55
	3	0.86	-	-	114	6.49
-20°C	1	0.85	0.71	100	111	6.56
	3	0.86	-	-	117	6.49
	18	1.00	0.69	-	117	6.29
2-8°C	1	0.85	0.71	100	109	6.61
	3	0.87	0.68	100	109	6.48
	6	0.90	0.73	99	110	6.54
30°C	1	0.70	0.71	99	109	6.30
	3	0.55	0.68	93	107	6.18
	40°C	0.5	0.65	96	110	6.36
	1	0.53	0.65	91	106	6.25

-40°Cおよび-20°Cの温度で保存されたリポソームは、3ヶ月の保存後、シスプラチンまたは白金の濃度において、測定可能な損失を何ら示さなかった。3ヶ月の保存期間後、リポソームのサイズまたは懸濁液のpHにおいて、有意な変化も観察されなかった。-20°Cで18ヶ月の保存後、シスプラチン濃度および白金濃度のいずれにおいても、有意な損失が何らなかつたことによって示されるように、シスプラチンはリポソーム中に保持された。リポソーム組成物はまた、2~8°Cで18ヶ月間保存した場合、安定であった。表1において見られるように、シスプラチンまたは白金の濃度において、測定可能な損失は、何ら観察されなかつた。18

ヶ月の時点では、被包された白金の割合は99%であり、このことは、1%以外の全ての被包された白金が、リポソーム中に保持されたことを示す。被包された白金がシスプラチンの形態であることはシスプラチン濃度から明らかであり、これは18ヶ月の保存期間にわたって減少しない。

30°Cおよび40°Cのより攻撃的な保存条件下で、シスプラチン濃度および白金濃

度のいくらかの減少が観察され、そして被包された白金の割合は、30°Cで3ヶ月後、93%であり、および40°Cで1ヶ月後、91%であった。リポソームのサイズにおいてわずかな変化が観察された。

データは、本発明のリポソーム組成物が、リポソーム中にシスプラチニンを保持するために有効であり、それによって安定なリポソーム組成物を提供することを示す。この安定性は、特に、2~8°Cで6ヶ月の時点まで明らかである。ここで、シスプラチニンの濃度は、一定に維持され、そして99%の白金がリポソーム中に被包された。

親水性ポリマー鎖の内部および外部表面被膜を有する本発明のリポソームを、「従来の」リポソーム、すなわち、親水性ポリマー鎖の内部および外部表面被膜を欠くリポソームと比較した。

実施例5に記載のように、シスプラチニン含有リポソームを、本発明に従って、50.6/44.3/5.1のモル比のHSPC/Chol/mPEG-DSPEから調製した。比較のリポソーム組成物を調製し、これは、mPEG-DSPEが同じモル量のジステアリルホスファチジルグリセロール(DSPG)（これは、mPEG-DSPEと同じ炭化水素尾部および極性頭部基における電荷を有する）で置換された以外は、本発明のリポソームと同一であった。親水性ポリマーを欠く比較のリポソーム組成物は、内部または外部脂質二重層のいずれにおいても、親水性ポリマー鎖の表面被膜を有しなかった。

第一の研究において（実施例5A）、リポソーム組成物を、60°Cで6時間インキュベートした。インキュベーション後、上記の手順に従って、リポソーム懸濁液のシスプラチニン濃度、被包された白金の割合、リポソームのサイズ、および懸濁液のpHを測定した。表2にまとめた結果は、インキュベーション期間の後、本発明のリポソーム組成物が、シスプラチニン濃度の24%（0.38mg/mlから0.29mg/mlへの）の減少を有したが、比較のリポソーム懸濁液のシスプラチニン濃度は、44%

（0.25mg/mlから0.14mg/mlに）減少したことを示す。本発明のリポソームの被包された白金の割合は、インキュベーション後に96%であった。比較のリポソームは、81%の被包白金の%を有し、このことは、19%の白金含有種がリポソームから漏出したことを示す。本発明の実施態様において、リポソーム組成物は、60°Cで

6時間保存する場合、約85%を越える、より好ましくは90%の被包された白金の割合により、特徴付けられる。

表 2

60°Cでの6時間のPEGコート化リポソームおよび比較のリポソームの安定性

処方物	インキュベーション濃度 おもむき 時間	シスプラチナ 濃度 (mg/ml)	% カドセル化 された白金	サイズ (nm)	pH
HSPC/cholesterol/PEG-DSPE	0	0.38	100	116	-
	60°C; 6時間	0.29	96	117	-
HSPC/cholesterol/DSPG (比較の組成物)	0	0.25	100	149	6.62
	60°C; 6時間	0.14	81	148	6.52

第2の研究において（実施例5B）、表2において表されるデータについて上述した組成物を有するリポソームは、40°Cで2週間インキュベートされ、そして結果を表3に示す。この研究において、リポソームは、実施例3Gにおいて記載する、ヒスチジン／スクロース／塩化ナトリウム希釀液中の1.0mg/mlのシスプラチナ濃度に希釈された。インキュベーション期間後、PEG被膜を有するリポソームを含有する懸濁液のシスプラチナ濃度において29%の（0.75から0.53mg/mlへの）減少が観察された。被包された白金の割合は、95%であった。このデータは、40°Cにて2週間のインキュベーション後、上述のように、シスプラチナの一部が別の分子種（例えば、モノヒドロキシモノクロロ シス-ジアミンプラチナ）に転換したこと、および約5%の白金含有種のみがリポソームから漏出したことを示す。

表 3

40°Cで2週間のPEGコート化リポソームおよび比較のリポソームの安定性

処方物	インキュベーション温度 および時間	シスプラチン濃度 (mg/ml)	% カドセル化 した白金	サイズ (nm)	pH
HSPC/chol/mPEG-DSPE	0	0.75	100	108	6.62
	40°C; 2週間	0.53	95	114	6.09
HSPC/chol/DSPG (比較の組成物)	0	0.51	100	146	6.53
	40°C; 2週間	0	81	137	5.84

比較のリポソーム組成物は、40°Cで2週間の保存後、リポソーム中に残存する測定可能なシスプラチンを何ら有しなかった。このことは、ほとんど全てのシスプラチンが別の分子種に転換したことを示唆する。81%の白金含有種が、リポソーム中に被包され、言い換えると、19%の白金含有種がリポソームから漏出した。明らかに、本発明に従って、親水性ポリマー鎖の内部表面被膜および外部表面被膜を有するように調製されたリポソームは、比較のリポソームよりも実質的に優れたシスプラチンの保持力を有する。

別の研究において、比較のリポソームが上述のように調製され、そして2~8°Cで2ヶ月間保存された。この研究についての安定性のデータを、比較のために、本発明に従って調製されたリポソームについての、同じ温度における表1からのデータとともに、表4にまとめる。

表4

2~8°Cでの2ヶ月間のPEGコート化リポソームおよび比較のリポソームの安定性

処方物	2~8°C での時間(日)	シスプラチン濃度 (mg/ml)	Pt濃度 (mg/ml)	% カドセル化 した白金	サイズ (nm)	pH
HSPC/chol/mPEG-DSPE	0	0.92	0.71	100	109	6.5
	1	0.85	0.71	100	109	6.61
	3	0.87	0.68	100	109	6.48
	6	0.90	0.73	99	110	6.54
	18	0.86	0.71	99	109	6.30
HSPC/chol/DSPG (比較の組成物)	0	0.51	0.44	100	146	6.53
	2	0.11	0.42	98	143	6.50

表4に示されるデータから、親水性ポリマー鎖の内部および外部表面被膜が欠損するリポソームと比較すると、このような表面被膜を有する本発明のリポソーム組成物は、リポソームからのシスプラチニンの損失を減少させるのに効果的であることが明らかである。特に、この2つの組成物についてのシスプラチニン濃度および被包された白金のパーセントの比較により明らかであるように、リポソーム組成物は、他の分子種へのシスプラチニンの転換を減少するのに効果的である。

まとめると、表2、3、および4に表される安定性データは、本発明に従って調製された、親水性ポリマー鎖の内部表面被膜および外部表面被膜を有するリポソームは、(1)他の分子種へのシスプラチニンの転換を減少すること、および(2)リポソームからのシスプラチニン(および他の白金含有種)の漏出を減少することにより、安定に捕獲された、シスプラチニンのリポソーム組成物を提供することを示す。

IV. インビボでの投与

本発明に従って調製されたシスプラチニン含有リポソームは、腫瘍担持マウスに投与され、そして抗腫瘍効力について、遊離のシスプラチニンおよび遊離のカルボプラチニンと比較された。実施例6に記載するように、C26結腸腫瘍モデルを担持

するマウスは、本発明のリポソーム捕獲化シスプラチニン組成物、遊離のシスプラチニン、または遊離のカルボプラチニンで処置された。遊離のシスプラチニンは、シスプラチニンの最大耐性用量である、6mg/kgで、1週間に1回、3週間、静脈内投与された。遊離のカルボプラチニンはまた、100mg/kgのシスプラチニンに臨床学的に等価な用量で、同じ頻度で、静脈内に与えられた。リポソーム捕獲化シスプラチニンは、遊離のシスプラチニンと同じ用量および同じ頻度の6mg/kgを1週間に1回、3週間、静脈内に投与された。

結果を図5に示す。ここでは、1mm³での腫瘍容量が、接種後の日数の関数として示される。試験群の処置は、約12日目に、約100mm³の触診可能な腫瘍塊が顕性になったときに開始された。x軸に沿う黒三角によって示されるように、試験群は、12、19、および26日目に処置された。生理食塩水(■)を受けた動物における腫瘍は、増殖し続けた。遊離のシスプラチニン(▲)または遊離のカルボプラチ

ン（●）で処置された動物は、未処置の動物に比べて、腫瘍増殖の同様の減少を有した。リポソームの内部表面および外部表面にポリエチレングリコールの被膜を有するリポソーム中に捕獲されたシスプラチン（▼）で処置された動物は、遊離の薬物で処置された動物に比べて、腫瘍のサイズの有意な減少を有した。

実施例6に従って別の研究を行った。ここでは、リポソーム捕獲化シスプラチンを異なる投薬スケジュールを行って投与された。すなわち、リポソーム捕獲化シスプラチンは、より多量の負荷用量で投与され、その後、2および3週目により少量の用量で投与された。結果を図6に示す。ここでは、6mg/kgで、1週間に1回、3週間、生理食塩水（■）および遊離のシスプラチン（▲）を受けた試験動物は、腫瘍塊の連続的な増加を示した。リポソーム捕獲化シスプラチンで処置された動物は、生理食塩水または遊離のシスプラチンで処置された動物に比べて、腫瘍塊を有意に減少した。リポソーム捕獲化シスプラチンの抗腫瘍効力は、1週間に1回、3週間、6mg/kg（●）の投薬スケジュール、12mg/kgの最初の用量、19および26日目の4mg/kgのその後の用量（◆）、および14mg/kgの最初の用量、19および26日目の4mg/kgのその後の用量（▼）について、同様であった。

Lewis肺ガン腫瘍モデルを担持するマウスは、シスプラチン（静脈内および腹腔内投与される）で、またはリポソーム捕獲化シスプラチン（同様に投与され

る）で処置された。実施例6に記載されるように、処置を、試験動物において約100mm³の触診可能な腫瘍塊が観察されたときに開始し、処置は、接種後7、14、および21日目に行った。腫瘍担持マウスのコントロール群は、生理食塩水で処置された。

結果を図7に示す。ここでは、1mm³での腫瘍容量が接種後の日数の関数としてプロットされる。処置は、7、14、21日目にx軸に沿う黒三角によって示される。生理食塩水（■）で処置されたマウスにおける腫瘍は、試験期間中、連続して増殖した。示された処置日に6mg/kgの用量で、静脈内（◆）または腹腔内（●）投与された遊離のシスプラチンに対する腫瘍塊の応答は、同様であった。示された処置日に、静脈内（▲）または腹腔内（▼）に投与された、12mg/kgのリポソーム捕獲化シスプラチンでの処置は、遊離のシスプラチンで処置された動物に

比べて改善された抗腫瘍効力を有した。静脈内および腹腔内投与は、等しく効果的であった。

上述から、本発明の種々の特徴および目的がどのように満たされるかが理解され得る。本発明のリポソーム組成物は、親水性ポリマー鎖の内部表面被膜および外部表面被膜、ならびに捕獲されたシスプラチニ化合物を有するリポソームを含む。本発明を支持して行われた研究は、いくつかの温度で種々の時間のインキュベーション後のジスプラチニおよび白金の保持により明らかであるように、シスプラチニが安定にリポソーム中に捕獲されることを実証する。

リポソーム中に安定に捕獲されるシスプラチニは、投与後、この薬物が、血流にほとんど漏出しないでリポソーム中に捕獲されたままであるので、遊離の形態で投与される薬物に比べて、減少された毒性および改善された効力の利点を提供する。PEG鎖の外部表面被膜は、長い血液循環寿命を提供し、リポソームが腫瘍のような標的部位に到達することを許容する。

V. 実施例

以下の実施例は、本発明の範囲を説明することを意図するが、本発明の範囲を限定することを意図しない。

材料：シスプラチニは、W.C.Heraeus GmbH (Hanau, Germany) から得た。DSPE

は、Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) から購入し、そしてメトキシ-ポリエチレングリコール (mPEG) MW2000ダルトンは、Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland) から得た。コレステロールはCroda, Inc., (NY, NY) から得た。HSPCは、Lipoid K.G. (Ludwigshafen, Germany) により作製され、そしてmPEG-DSPEは、Sygena, Inc., (Liestal, Switzerland) により作製された。

実施例 1

塩化シアヌル酸により結合されたPEG誘導体化DSPEの調製

A. 活性化PEGの調製

以前に活性化PEGと称した、2-O-メトキシポリエチレングリコール1900-4, 6-ジクロロ-1, 3, 5トリアジンを、以下の改変を伴って、J. Biol. Chem. 252:3582 (1977) に記載されるように調製した。

塩化シアヌル酸 (5.5g ; 0.03mol) を、10gの無水炭酸ナトリウムを含有する400mlの無水ベンゼンに溶解し、そしてPEG-1900 (19g ; 0.01mol) を添加し、その混合物を室温で一晩攪拌した。溶液を濾過し、そして600mlの石油エーテル（沸騰範囲、35~60°C）を、攪拌しながらゆっくりと添加した。微細に分割された沈殿をフィルター上で回収し、400mlのベンゼンに再溶解した。沈殿および濾過プロセスを、石油エーテルが、ヘキサンで展開される、5-m「LiChrosorb」(E. Merck) のカラム (250×3.2mm) における高压液体クロマトグラフィーによって測定され、そして紫外線検出器で検出されるように、残余の塩化シアヌル酸がなくなるまで数回反復した。PH10.0、室温で、水性緩衝液中で一晩、加水分解した後、硝酸銀を用いる活性化PEG-1900の滴定は、遊離された塩化物/molPEGの1.7molの値を与えた。

生成物のTLC分析を、Bakerから得られるTLC逆相プレートを用いて、展開液としてメタノール：水、4 : 1 (v/v) を用いて、および可視化のためにヨウ素蒸気に暴露して達成した。これらの条件下で、開始メトキシポリグリコール1900は、 $R_f = 0.54 \sim 0.60$ に出現した。活性化PEGは、 $R_f = 0.41$ に出現した。未反応の塩化シアヌル酸は、 $R_f = 0.88$ に出現し、そしてこれを除去した。

活性化PEGを、窒素について分析し、そしてさらなる合成工程において使用するための反応物の量を選択する際に適切な補正を適用した。従って、生成物が窒素の理論上の量のわずか20%を含んだ場合、次の合成工程において使用される物質の量を100/20、すなわち5倍に増加させた。生成物が窒素の理論上の量の50%を含んだ場合、わずか100/50すなわち2倍の増加が必要であった。

B. N-(4-クロロ-ポリグリコール1900)-1,3,5-トリアジニルエッグホスファチジルエタノールアミンの調製

ネジぶた付き試験管において、クロロホルム中のエッグホスファチジルエタノールアミンの100mg/ml (0.100mmol) ストック溶液の0.74mlを、エバボレートして、窒素流下で乾燥させ、そしてA節に記載した活性化PEGの残渣に、205mg (0.100mol) を提供する量で添加した。この混合物に、5mlの無水ジメチルホルムアミドを添加した。 $27\mu l$ (0.200mmol) のトリエチルアミンを混合物に添加し、

そして雰囲気を窒素ガスに置換えた。混合物を、110°Cに維持されたサンドバスにおいて、一晩、加熱した。

次いで、混合物を減圧下でエバポレートして、乾燥させ、そして糊のような固まりの結晶性の固体を得た。この固体を、4容量のアセトンと1容量の酢酸との混合液5mlに溶解した。得られた混合物を、シリカゲル (Merck Kieselgel 60、70~230メッシュ) を充填した21mm×240mmのクロマトグラフィー吸着カラム（これは、まずアセトン酢酸 (80/20、v/v) からなる溶媒で湿らせた）の上面に置いた。

カラムクロマトグラフィーと同じ溶媒混合物で展開し、そして溶出物の異なる20~50mlのアリコートを回収した。溶出物の各部分を、展開液として2-ブタノン／酢酸／水；40/25/5；v/v/vを、および可視化のためにヨウ素蒸気暴露を用いて、シリカゲルでコートされたプレートにおけるTLCにより、アッセイした。R_f=約0.79の物質のみを含有する画分を合わせ、そして減圧下でエバポレートして、乾燥させた。高減圧下で、一定重量に乾燥することにより、86mg (31.2 μモル) のほぼ透明な固体の、リンを含有するN-(4-クロロ-ポリグリコール1900)-1,3,5,-トリアジニルエッギングホスファチジルエタノールアミンが生成された。

固体化合物を、24mlのエタノール／クロロホルム；50:50に取り、そして遠心分離して、不溶性の物質を除去した。明澄化した溶液の減圧下でのエバボレーションによる乾燥により、21mg (7.62 μモル) の無色の固体が生成された。

実施例2

カルバメート (carbamate) により結合されたPEG誘導体化DSPEの調製

A. ポリエチレングリコールメチルエーテル1900のイミダゾールカルバメートの調製

Aldrich Chemical Co. から得られた、9.5グラム (5mモル) のポリエチレングリコールメチルエーテル1900を、分子ふるい上で乾燥された45mlのベンゼンに溶解した。0.89グラム (5.5mモル) の純粋なカルボニルジイミダゾールを添加した。純度を赤外線スペクトルにより確認した。反応容器中の空気を窒素で置換した。容器を密封し、そして75°Cで16時間、サンドバスにおいて加熱した。

反応混合物を冷却し、そして室温で透明な溶液が形成された。溶液を乾燥ベンゼンを用いて50.0mlに希釈し、そして冷蔵庫において、PEGエーテル1900のイミダゾールカルバメートの100 μ モル/mlのストック溶液として保存した。

B. ポリエチレングリコールメチルエーテル1900のホスファチジルエタノールアミンカルバメートの調製

ポリエチレングリコールメチルエーテル1900（化合物X）のイミダゾールカルバメートの100mmol/mlストック溶液の10.0ml（1mmol）を、10mlのナシ型フ拉斯コにピペッティングした。溶媒を減圧下で除去した。クロロホルム中のエッグホスファチジルエタノールアミン（V）の100mg/ml溶液の3.7ml（0.5mmol）を、添加した。溶媒を、減圧下でエバボレートした。2mlの1,1,2,2-テトラクロロエチレンおよび139 μ l（1.0mmol）のトリエチルアミンVIを添加した。溶液を密封し、そして95°Cに維持したサンドバスにおいて6時間、加熱した。この時に、展開液としてブタノン／酢酸／水；40/5/5；v/v/vを使用して、上記の混合物の画分を用いて薄層クロマトグラフィーを行い、SiO₂でコートされたTLCプレートにおける結合の程度を決定した。ヨウ素蒸気の可視化により、R_f=0.68の遊離のホスファチジルエタノールアミンのほとんどが反応し、そしてR_f=0.78～0.80にてリン

含有脂質に置換されたことが示された。

残余の反応混合物からの溶媒を、減圧下でエバボレートした。10mlの塩化メチレンに残渣を取り、そしてMerck Kieselgel 60（70～230メッシュシリカゲル）を充填した21mm×270mmのクロマトグラフィー吸着カラム（これは、先ず塩化メチレンでリーンスした）の上面に置いた。その後、以下の溶媒を用いて、カラムを介して、混合物を通過させた。

ml	<u>塩化メチレンの容量%</u>	<u>2%酢酸を有するメタノール容量%</u>
100	100	0
200	95	5
200	90	10
200	85	15
200	60	40

溶出物の50ml部分を回収し、そして各部分を、クロロホルム／メタノール／水／濃水酸化アンモニウム；130/70/8/0.5%；v/v/v/vで展開後、可視化のためにI₂蒸気吸収を用いて、SiO₂でコートされたプレートにおけるTLCによりアッセイした。ほとんどのリン酸化物が、11, 12, 13、および14画分において見出された。

これらの画分を合わせ、減圧下でエバボレートして乾燥し、そして高減圧下で一定重量に乾燥した。これにより、ポリエチレングリコールメチルエーテルのホスファチジルエタノールアミンカルバメートの、669mgの無色のワックスを得た。これは、ホスファチジルエタノールアミンに基づいて、263μモルおよび52.6%の収率を表した。

重水素クロロホルム (deutero-chloroform) に溶解された生成物のNMRスペクトルは、δ = 3.4ppmにてエチレンオキシド鎖のメチレン基に起因する強い一重項とともに、エッグPEについてのスペクトルに対応するピークを示した。PEアシル基の末端メチルプロトンに対するエチレンオキシド由来のメチレンプロトンの割合は、所望の生成物であるホスファチジルエタノールアミンカルバメートを結合されたポリエチレングリコール (M.W. 2,654) の分子のポリエチレンオキシド部分について、約2000の分子量を確認するのにきわめて十分であった。

実施例3

リポソームの調製

A. 工程1：薬物溶液の調製

滅菌水を、テフロンで裏打ちされた圧力容器において63～67°Cに加熱し、そして塩化ナトリウム (0.9%) を添加した。シスプラチンを8.5mg/mlの濃度で添加し、そして溶解するまで、約15～25分間、混合した。

B. 工程2：脂質溶解

257.0gのPEG-DSPE、719.4gのHSPC、および308.4gのコレステロール (50.6/44.3/5.1のモル比) を、60～65°Cで、900mlの脱水されたエタノールに添加し、そして溶解するまで、約2時間混合した。溶解した脂質を7670gの薬物溶液に添加して、約150mg/mlの全脂質濃度を得た。

C. 工程3：脂質水和／薬物負荷

加温した脂質溶液を、迅速に加温（63～67°C）薬物溶液に、混合しながら添加して、不均質なサイズを有するリポソームの懸濁液を形成させた。懸濁液を、1時間63～67°Cにて混合した。水和混合物中のシスプラチニン濃度は7.2mg/mlであり、そしてこの段階で、約30%の薬物がリポソーム中に被包された。全溶液容量の10%はエタノールであり、および全脂質濃度は150mg脂質/mlであった。

D. 工程4：押し出し

リポソームを、テフロンで裏打ちされたステンレススチール容器中に保存されたポリカーボネートフィルターカートリッジを介する制御された押し出しにより、所望の平均直径を有する粒子にサイズ分画した。押し出しプロセスの間中、6～8時間の間、リポソーム懸濁液を、63～65°Cに維持した。

E. 工程5：低級濾過

サイズ分画後、リポソーム懸濁液を室温（20～25°C）に冷却し、そして $1.2\mu m$ Gelman Versaporフィルター（Nylon 66支持体上のアクリル性コポリマー）を介して濾過して、沈殿した薬物を取り出した。この段階で約50%の薬物が被包された。

F. 工程6：ダイアフィルトレーション

スクロース／塩化ナトリウム溶液を、スクロース（100mg/ml）および塩化ナトリウム（0.058mg/ml）を滅菌水に溶解することによって調製した。溶液のpHを2NのHClまたはNaOHで、約5.5に調整した。溶液を、 $0.22\mu m$ のDuraporeフィルターを通して濾過した。

リポソーム懸濁液を、スクロース／塩化ナトリウム溶液で、約1：1（v/v）比に希釈し、そしてポリスルホン中空纖維限外濾過を通してダイアフィルトレートした。スクロース／塩化ナトリウム溶液に対して、8容量の交換を行い、エタノールおよび被包されていない薬物を除去した。プロセス液の温度を、約20～30°Cに維持した。全ダイアフィルトレーション時間は、約4.5時間であった。

次いで、リポソーム懸濁液を、限外濾過により約1.2mgシスプラチニン/mlに濃縮した。ダイアフィルトレーションプロセス後の液を、シスプラチニン含有量について、HPLCにより分析した。リポソームは、0.9%塩化ナトリウム中の8.5mg/ml

シスプラチニの内部相およびスクロース／塩化ナトリウム溶液の外部相を有した。
。

G. 工程7：希釈

最終混合液中の1.55mg/mlの標的ヒスチジン濃度に対して、スクロース／塩化ナトリウム（10%スクロース／1mM NaCl）溶液中のヒスチジン（10mM）を溶解することにより、希釈液を調製した。リポソーム懸濁液を、ヒスチジン希釈液を用いて1.05mg/mlの標的シスプラチニ濃度に希釈した。懸濁液のpHを、2NのNaOHまたはHClで6.5に調整した。

H. 工程8：滅菌濾過

リポソーム懸濁液を33～38°Cに加熱し、そして0.2μm Gelman Suporポリエーテルスルホンフィルターを介して濾過した。全濾過時間は、約10分であった。

実施例4

シスプラチニリポソームの安定性

シスプラチニ含有リポソームの懸濁液を、実施例3に記載のように調製した。リポソーム懸濁液の5mlのアリコートを10ccのガラスバイアル中に置き、無菌条件下密封し、そして以下の温度：-40°C、-20°C、2～8°C、30°C、40°Cで、インキュベーターまたは冷蔵庫中に置いた。時々、各温度で保存された各バイアルから

のサンプルを取り出し、そして3連で、以下について試験した：

1. シスプラチニ濃度：シスプラチニの濃度を、有機溶媒でリポソームの脂質二重層を破壊して、捕獲されたシスプラチニを放出させ、次いで高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）によってシスプラチニの濃度を測定することにより、測定した；
2. 白金濃度、原子吸収により測定した；
3. 被包白金の割合：被包された白金のパーセントを、サイズ排除クロマトグラフィーにより被包されていないシスプラチニからリポソームを分離し、そして原子吸収によって、白金含有量についてリポソーム画分および薬物画分をアッセイすることにより、測定した；
4. リポソームのサイズ；動光散乱により測定した；および

5. リポソーム懸濁液のpH。

結果を表1に示す。

実施例5

比較の安定性研究

本発明のリポソームと比較するために、親水性ポリマー鎖の内部および外表面被膜を有しないシスプラチニ含有リポソームを調製した。比較のリポソームを、PEG-DSPE誘導体の代わりにジステアリルホスファチジルグリセロール (DSPG) を用いた以外は、実施例3に記載のように調製した（例えば、50.6/44.3/5.1のモル比のHSPE/Chol/DSPGからなるリポソーム組成物）。

A. 60°Cで6時間のインキュベーション

比較のリポソーム組成物および本発明のリポソーム組成物の安定性を、生理食塩水でリポソームサンプルを希釈し（1:1 v/v）、そして懸濁物を60°Cで6時間インキュベートすることにより、比較した。インキュベーション後、サンプルを、実施例4に記載の手順に従って、シスプラチニの濃度、被包された白金の%、リポソームのサイズ、およびpHについて試験した。結果を表2にまとめた。

B. 40°Cで2週間のインキュベーション

リポソーム組成物を、実施例3Gにおいて記載したヒスチジン／スクロース／

塩化ナトリウム希釈液で1mg/mlのシスプラチニ濃度に希釈した。リポソーム懸濁液を、40°Cで2週間インキュベートし、その後シスプラチニの濃度、被包された白金の%、リポソームのサイズ、およびpHを測定した。

実施例6

腫瘍担持マウスの処置

捕獲されたシスプラチニ含有するリポソームを、実施例3に記載のように調製し、そしてこれは、50.6/44.3/5.1のモル比のHSPC、コレステロール、mPEG-DSPEからなった。全脂質濃度は約71mg/mlであり、そしてシスプラチニ濃度は1mg/mlであった。

A. C26結腸腫瘍モデル

C26結腸腫瘍モデルを、Balb/c雄性マウス (Simonson Laboratories, Inc.、Gi

lroy, CA)において増殖させた。ドナーマウスから腫瘍を採取し、そして10%胎児ウシ血清(FCS)を含有するRPMI培地中で微細に切り刻んだ。次いで、腫瘍を酵素混合物(10mlの、Hank's平衡化塩溶液(HBSS)中の0.25%のプロテアーゼタイプIXおよび0.25%のコラゲナーゼIV型および0.2%mlの、HBSS中の0.02%のDNase)で、30~60分間、37°Cで分解した。腫瘍細胞の単一の細胞懸濁液をFCS含有RPMI培地中で2回洗浄し、遠心分離により濃縮し、そして接種のためにFCS含有RPMI培地中に再懸濁した。100万個の腫瘍細胞(0.1ml)を、5~6週齢のマウスの左腹に接種した。

全ての実験を通して、動物を12時間の明暗周期に維持し、嚙齒類に食物および水を任意に与えた。

i. 遊離の薬物、およびリポソーム捕獲化薬物の比較

腫瘍担持マウスを、表5に示した処置レジメに従って、リポソーム捕獲化シスプラチニン、遊離のシスプラチニン(Platinol-AQ®、Bristol Laboratories, Princeton, NJ)または遊離のカルボプラチニン(Paraplatin®、Bristol Laboratories)での処置について、n=9の群に分割した。

表5

試験化合物	静脈内用量	累積用量	頻度
生理食塩水	0.1 ml	-	週間に1回: × 3
シスプラチニン	6 mg/kg	18 mg	1週間に1回: × 3
カルボプラチニン	100 mg/kg	300 mg	1週間に1回: × 3
リポソームシスプラチニン	6 mg/kg	18 mg	1週間に1回: × 3

遊離のシスプラチニンおよびリポソーム捕獲化シスプラチニンを、毎週6mg/kgの用量で、3週間、静脈内投与した。カルボプラチニンを、毎週100mg/kgの用量で、3週間、静脈内投与した。コントロール群のマウス(n=5)に、0.1mlの生理食塩水を、静脈内に毎週、3週間投与した。結果を図5に示す。

ii. 変更された投与スケジュール

マウスを、上記の手順に従って、C26結腸腫瘍細胞で接種した。腫瘍担持マウ

スの処置を、大多数の動物が、約100mm³ の触診可能な腫瘍塊を有した時に開始した。マウスを、表6に示すレジメに従って、リポソーム捕獲化シスプラチンまたは遊離のシスプラチンで、1週間に1回、3週間、処置した。

試験化合物	静脈内用量	累積用量	頻度
生理食塩水	0.1 ml	-	1週間に1回 × 3
シスプラチン	6 mg/kg	18 mg/kg	1週間に1回 × 3
リポソームシスプラチン	14/4/4 mg/kg ¹	22 mg/kg	1週間に1回 × 3
リポソームシスプラチン	12/4/4 mg/kg ¹	20 mg/kg	1週間に1回 × 3
リポソームシスアラシン	6 mg/kg	18 mg/kg	1週間に1回 × 3

¹ 最初の負荷用量後、2回のより少量の用量。

遊離のシスプラチンを、6 mg/mlの用量で、1週間に1回、3週間、腫瘍担持マウス (n=9) に静脈内投与した。上記のように調製した、リポソーム中に捕獲されたシスプラチンを、3つの投薬スケジュールに従って、腫瘍担持マウスに静

脈内投与した。一つの群 (n=9) は、6mg/kgのリポソーム捕獲化シスプラチンを1週間に1回、3週間受け；別の群 (n=9) は、14mg/kgの最初の用量を受け、次いで、2および3週目に4 mg/kgのその後の用量を受けた；別の群 (n=9) は、12mg/kgの最初の用量を受け、次いで、研究の2および3週目において、4 mg/kgを受けた。コントロール群 (n=5) は、各処置日に、生理食塩水を受けた。結果を図6に示す。

B. Lewis肺腫瘍モデル担持マウス

Lewis肺腫瘍 (LL/2、CRL-1642、ATCC、Rockville、MD) モデルを、G6C3-F1、雄性マウス (Simonson Laboratories, Inc.、Gilroy、CA) において増殖させた。ドナーマウスから腫瘍を採取し、そして上記の実験の接種についてのように処理した。100万個の腫瘍細胞 (0.1ml) を、5～6週齢の雄性B6C3-F1マウスの左わき腹に接種した。

腫瘍担持動物の処置は、接種の7日後、大多数のマウスが、触診可能な腫瘍塊を有したときに開始した。動物を、表7に示すレジメに従って、処置した。

試験化合物	用量(経路)	累積用量	頻度
生理食塩水	0.1 ml (IV)	-	[週間] = [回] × 3
シスプラチン	6 mg/kg (IV)	18 mg/kg	[週間] = [回] × 3
シスプラチン	6 mg/kg (IP)	18 mg/kg	[週間] = [回] × 3
リポソームラスアラチン	12 mg/kg (IV)	36 mg/kg	[週間] = [回] × 3
リポソームラスアラチン	12 mg/kg (IP)	36 mg/kg	[週間] = [回] × 3

コントロール群 (n=9) に、処置日 (7、14、および21日目) に生理食塩水を投与した。2つの群の動物に、各処置日に、遊離のシスプラチニンを 6 mg/kgで投与した; 一方の群 (n=9) において、遊離のシスプラチニンを、静脈内投与し、他方の群 (n=9) において、薬物を腹腔内投与した。2つの群には、各処置日に、リポソーム捕獲化シスプラチニンを12mg/kgで投与し; 一方の群 (n=7) には、用量を静脈内で投与し、他方の群 (n=9) には、用量を腹腔内で投与した。結果を表7に示す。

本発明は、特定の実施態様に関して記載されたが、種々の変更および改変が、本発明から逸脱することなくなされ得ることが当業者に理解される。

【図1】

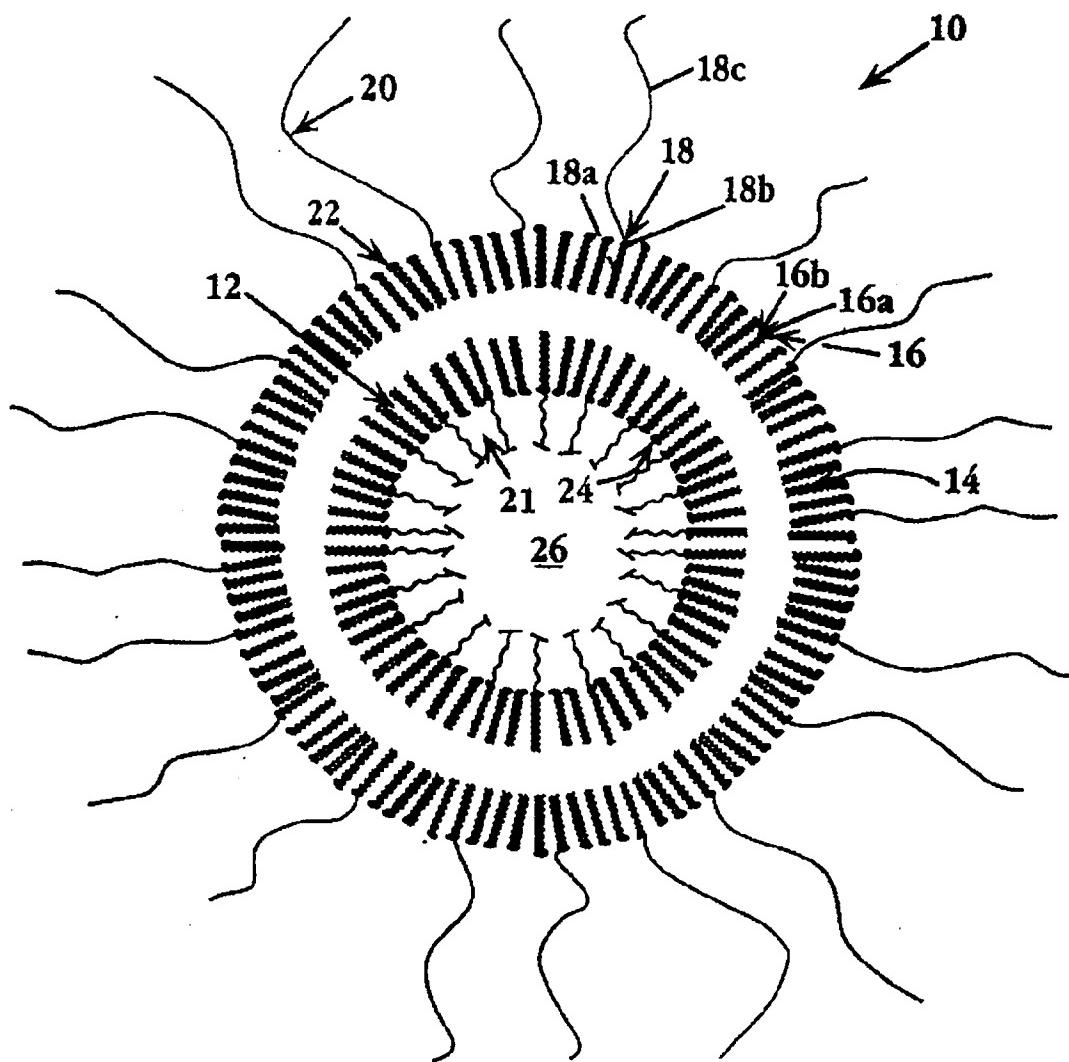


Fig. 1

【図2】

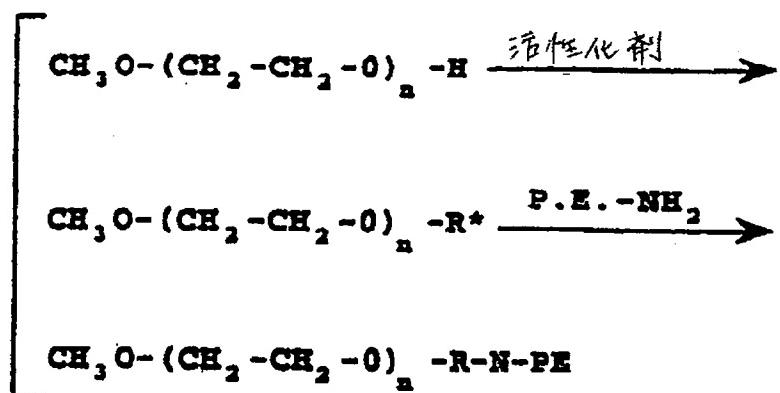


Fig. 2

【図3】

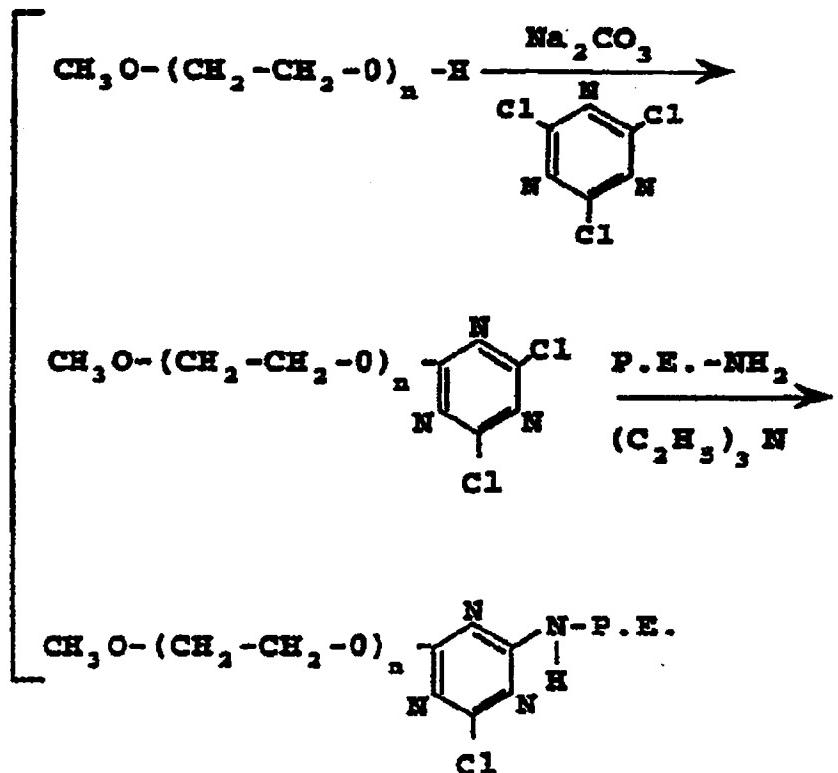


Fig. 3

【図4】

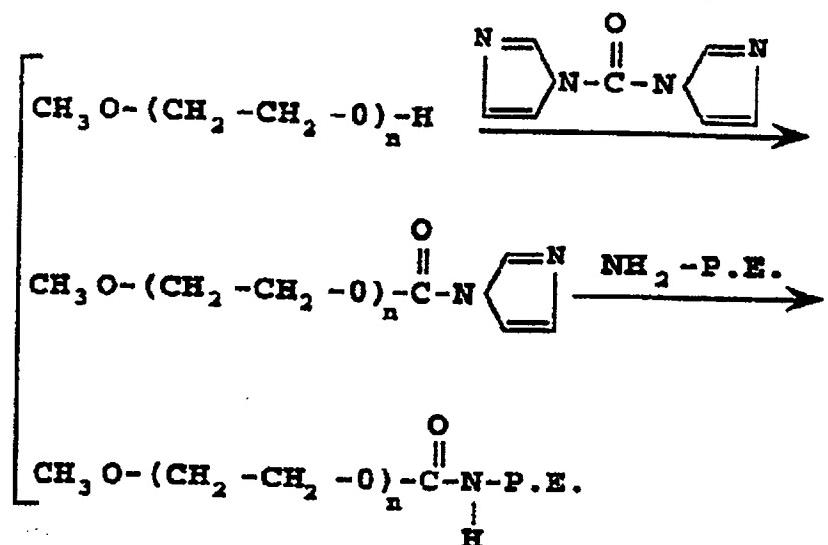


Fig. 4

【図5】

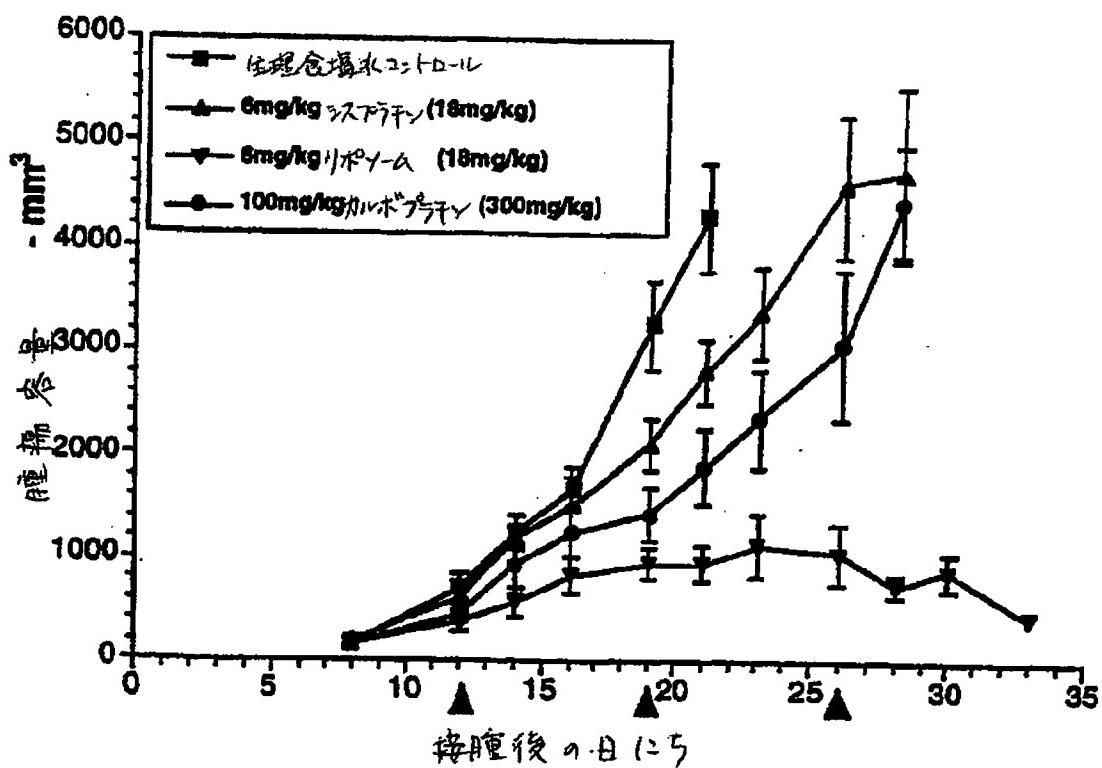


Fig. 5

【図6】

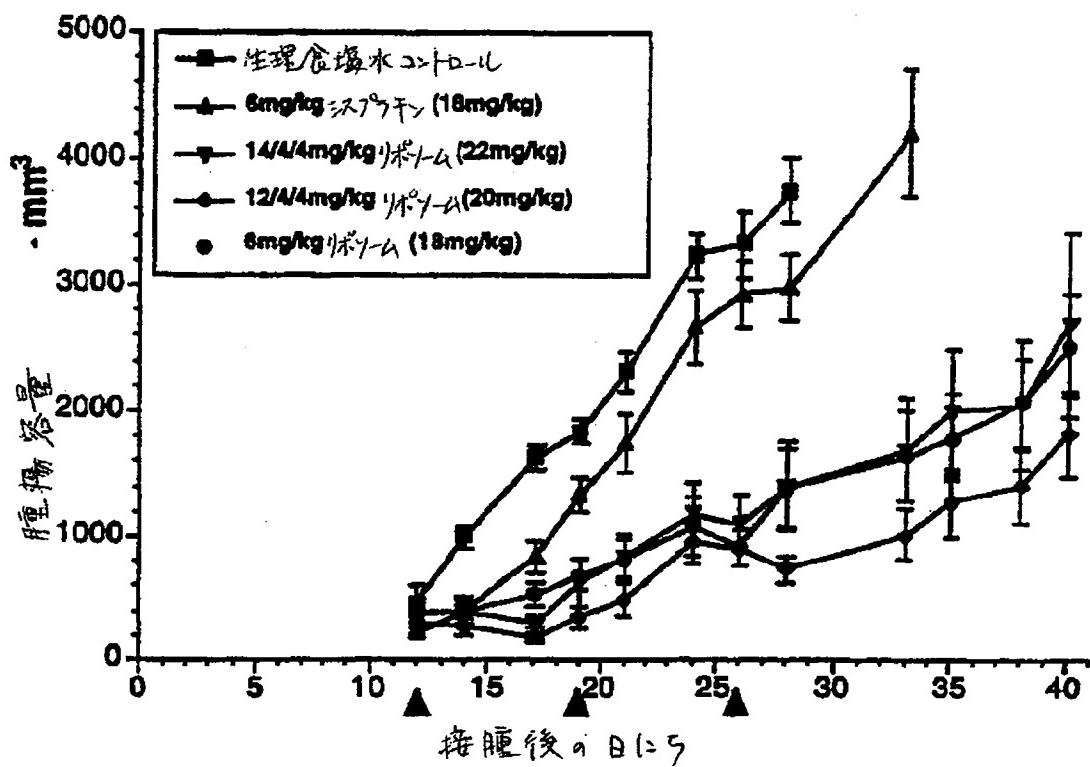


Fig. 6

【図7】

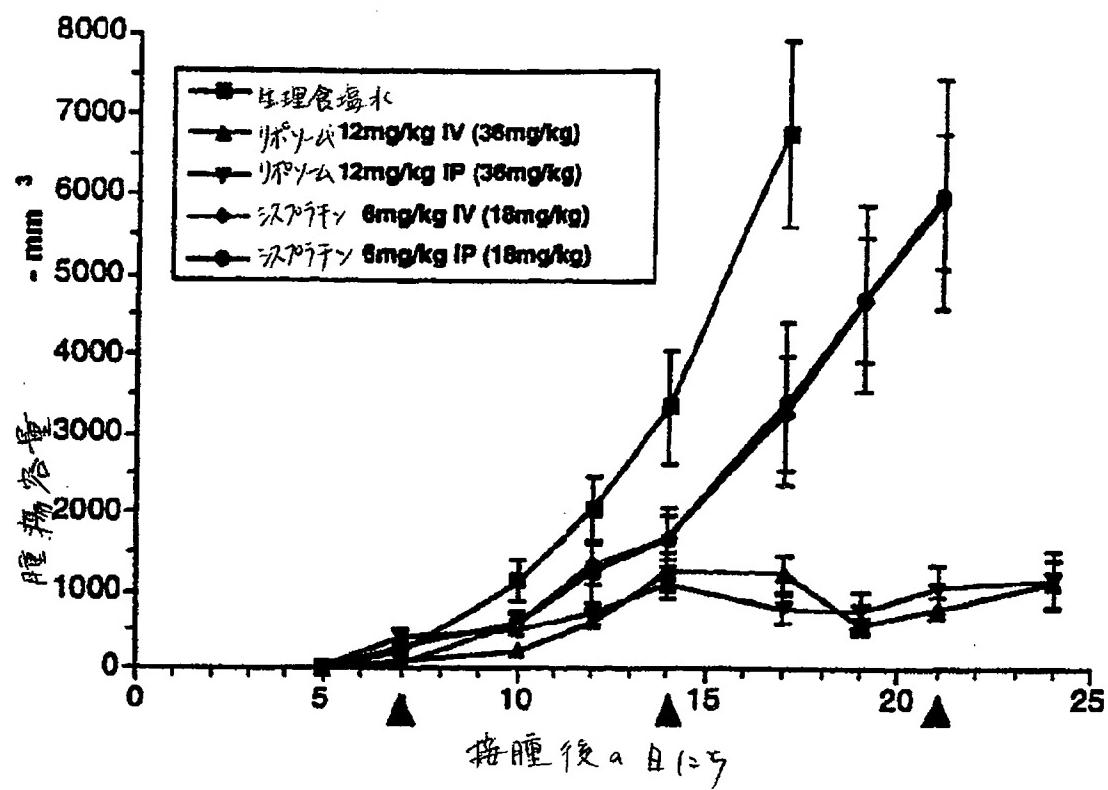


Fig. 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 97/14541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/127 A61K33/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 91 05546 A (LIPOSOME TECHNOLOGY, INC.) 2 May 1991 see page 59; example 10 see claims 1-8 & US 5 013 556 A cited in the application ---	1-14
Y	EP 0 551 169 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES) 14 July 1993 see the whole document ---	1-14
A	D.D. LASIC: "STERICALLY STABILIZED VESICLES" ANGEWANDTE CHEMIE INT. ED., vol. 33, no. 17, 16 September 1994, WEINHEIM (DE), pages 1685-1698, XP000465274 see page 1687; figure 4 ---	1-14 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

^a Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
---	--

6 November 1997

14/11/1997

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 97/14541

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 526 700 A (MITSUBISHI KASEI CORPORATION) 10 February 1993 see claim 7 see page 3, line 27 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 97/14541

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9105546 A	02-05-91	US 5013556 A AT 115401 T AT 122229 T AU 642679 B AU 6637490 A AU 654120 B AU 6898291 A CA 2067133 A CA 2067178 A,C DE 69015207 D DE 69015207 T DE 69019366 D DE 69019366 T EP 0496813 A EP 0496835 A ES 2071976 T HK 14097 A IL 96069 A IL 96070 A JP 5501264 T JP 5505173 T LU 88854 A US 5527528 A WO 9105545 A US 5620689 A US 5225212 A US 5213804 A US 5356633 A	07-05-91 15-12-94 15-05-95 28-10-93 16-05-91 27-10-94 16-05-91 21-04-91 21-04-91 26-01-95 04-05-95 14-06-95 05-10-95 05-08-92 05-08-92 01-07-95 14-02-97 08-12-95 30-03-95 11-03-93 05-08-93 11-03-97 18-06-96 02-05-91 15-04-97 06-07-93 25-05-93 18-10-94
EP 551169 A	14-07-93	CA 2086917 A JP 5255070 A	11-07-93 05-10-93
EP 526700 A	10-02-93	JP 4346918 A CA 2069244 A US 5264221 A	02-12-92 24-11-92 23-11-93

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF,
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,
SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD,
SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG,
, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT
, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA,
CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE
, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE
, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
UA, UG, UZ, VN, YU, ZW